

ISBN: 978-979-96348-9-4

PROSIDING SEMINAR NASIONAL MAPEKI XII

BANDUNG, 23-25 JULI 2009

*Pengembangan Teknologi Pengolahan dan
Pengembangan Hasil Hutan Dalam Rangka
Mendukung Pembangunan Nasional*

Kerjasama:



**Pusat Penelitian dan
Pengembangan Permukiman
Kementerian Pekerjaan Umum**



**Masyarakat Peneliti
Kayu Indonesia (MAPEKI)**

Pengembangan Teknologi Pengolahan dan Pengembangan Hasil Hutan Dalam Rangka Mendukung Pembangunan Nasional

**Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Peneliti Kayu Indonesia (MAPEKI) XII
Bandung, 23-25 Juli 2009**

Editor: Sukma Surya Kusumah, S.Hut., M.Si.
Prof. Dr. Ir. Muh. Yusram Massijaya, M.S.
Dr. Ir. Anita Firmanti, MT.
Dr. Ir. Subyakto, M.Sc.
Ir. Deded Sarip Nawawi, M.Sc.
Dr. Ir. I Nyoman J. Wistara, M.Sc.
Suhasman, S.Hut., M.Si.
Istie Sekartining Rahayu, S.Hut., M.Si.
Arinana, S.Hut., M.Si.
Lucky Risanto, S.Si.

Team Teknis: Linda Kriswati, S.E.
Wahyu Hidayat

Diterbitkan oleh Masyarakat Peneliti Kayu Indonesia
Sekretariat : Departemen Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan IPB
Kampus IPB Darmaga Bogor 16680
Bogor
Telp. : 0251-8621285
Fax. : 0251-8621285
E-mail : mapeki_group@yahoo.com
Website : <http://www.mapeki.org>

6. Karakteristik Spesies Pleurotoid: Kajian Morfologi, Fisiologi Dan Ligninolitik Serta Potensinya Untuk 692-703
Elis Nina Herliyana, Dodi Nandika, Achmad, Lisdar I. Sudirman dan Arief B. Witarto
7. Pemanfaatan Ekstrak Kulit Laban (*Vitex pubescens* Vahl) sebagai Bahan Anti Jamur 704-714
Enih Rosamah, Irawan Wijaya Kusuma dan Deny Kurniawan
8. Evaluation of isolated compounds from wood of *Artocarpus heterophyllus* as a cosmetic agent..... 715-722
Enos Tangke Arung , Kuniyoshi Shimizu, Ryuichiro Kondo
9. Identifikasi Molekuler Jamur Pembusuk Kayu dari Pohon Kanker Meranti Merah (*Shorea smithiana*) dan Meranti Kuning (*Shorea gibbosa*)..... 723-728
Erwin, Shuhei Takemoto, Yuji Imamura
10. Senyawa Naftokuinon dengan Aktivitas Anti Dermatofita dari *Eleutherine americana*..... 729-733
Irawan Wijaya Kusuma, Joko Susilo, Enos Tangke Arung
11. Sifat Anti Cendawan *Trichophyton mentagrophytes* dan *Candida albicans* dari Zat Ekstraktif Kayu Pelanjau (*Pentaspadon motleyi* Hook.f.)..... 734-743
F. Yusro, W. Syafii, dan E.S. Pribadi
12. Sifat Kimia Pada Kayu Jati (*Tectona grandis* L.f.) Dengan Pertumbuhan Eksentris..... 744-753
Ganis Lukmandaru
13. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Tahongai (*Kleinhovia Hospita* Linn.) . 754-766
Juli Astuti, Enos Tangke Arung dan Wiwin Suwinarti
14. Pendugaan Kandungan Biomassa Dan Karbon Bambu Andong (*Gigantochloa robusta*) dan Bambu Kuning (*Bambusa Vulgaris*) Di Kebun Bambu Biomaterial - Lipi, Cibinong – Jawa Barat 767-772
Lilik Astari, Ismail Budiman dan Mohamad Gopar
15. Variasi Sifat Kimia Kayu Gelam Akibat Kondisi Berbeda dan Lama Pemakaian..... 773-790
Mahali, I Nyoman Surasana, dan Prahesti
16. Uji Coba Hutan Tanaman Campuran Jenis Alternatif Penghasil Pulp..... 791-803
Nina Mindawati dan A.Syaffari Kosasih
17. Perbedaan Kualitas Kulit Samak Dari Berbagai Provenans 804-813
Panji Probo Saktianggi, Kasmudjo, dan Rini Pujiarti

Identifikasi Molekuler Jamur Pembusuk Kayu dari Pohon Kanker Meranti Merah (*Shorea smithiana*) dan Meranti Kuning (*Shorea gibbosa*)

Erwin¹, Shuhei Takemoto², Yuji Imamura³

¹Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Jln. Ki Hajar Dewantara No.1, Samarinda 75123, Indonesia

²Plant Pathology Research Team, National Institute of Fruit Tree Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

³Research Institute for Sustainable Humanosphere (RISH), Kyoto University, Uji, Kyoto 611 – 0011, Japan

Abstract

By molecular technique, identification of decay fungi isolated from decayed wood of the tree canker of red meranti (*Shorea smithiana*) and yellow meranti (*Shorea gibbosa*) have been carried out. In this molecular identification, the ITS region of rDNA of fungal isolates were amplified using PCR. The DNA sequence for each fungus was aligned together with that of known species in the GenBank database (National Centre for Biotechnology Information) US National Institute of Health Bethesda. By BLAST method and phylogenetic analysis based on the sequences of the ITS region of rDNA, Basidiomycete fungi isolated from decayed wood of red meranti and yellow meranti could be identified. The presence of ascomycete fungi on the decayed wood samples was also detected.

Key words: Wood decay fungi, ITS, rDNA, BLAST, Phylogenetic analysis

PENDAHULUAN

Investigasi gejala pohon-pohon kanker yang mengalami busuk batang sering dilakukan namun tidak jarang menemukan kesulitan dalam mendapatkan informasi jenis jamur pembusuk yang tumbuh dan berkembang dalam jaringan kayu-kayu tersebut (**Djumali 1999; Rahayu 1999**). Di pihak lain, efektifitas dan akurasi pengidentifikasian jamur pembusuk kayu sangat diperlukan karena berperan penting dalam upaya pengembangan lebih lanjut teknik dan metode kontrol pembusukan pohon-pohon kanker di dalam hutan.

Dewasa ini penggunaan berbagai metode molekuler untuk mengidentifikasi jenis jamur pembusuk kayu terus meningkat (**Claudia, et al. 2000; Cortesi et al. 2000; Blanchette et al. 2004; Diehl et al. 2004; Kim et al. 2005**). Metode-metode ini memberikan informasi molekul-molekul genetik turunan dari target organisme yang diakui lebih cepat, objektif dan akurat daripada metode klasik (**Diehl et al. 2002; Schmidt 2006**). Selain itu, metode ini juga dapat memberikan berbagai macam informasi berkaitan dengan hubungan filogeny antar organisme yang berguna untuk studi taksonomi dan klasifikasi organisme (**Hibbett and Donoghue, 2001**).

Salah satu metode molekuler yang paling cepat namun akurat memberikan informasi genetik untuk identifikasi jamur adalah metode sekuen terhadap karakteristik daerah DNA (*deoxyribonucleic acid*) dari target organisme. Dalam metode ini sekuen DNA target dibandingkan dan dicocokkan dengan DNA jamur yang disimpan dalam database DNA yang telah dipublikasikan ke publik. Pada metode ini, daerah DNA yang dimaksud adalah rDNA ITS (*ribosomal DNA internal*

transcribed spacers) yang merupakan daerah genomik yang cukup luas penggunaannya dalam sistematika dan identifikasi jamur.

Telah dilaporkan sebelumnya bahwa pembusukan kayu batang pohon kanker meranti merah (*Shorea smithiana*) dan meranti kuning (*Shorea gibbosa*) memiliki ciri-ciri yang sama dengan pola pembusukan kayu yang disebabkan oleh jamur-jamur pembusuk putih (*white-rot fungi*) (Erwin *et al.* 2005a; 2006b). Untuk mengkonfirmasi kehadiran dan memastikan jenis jamur pembusuk putih tersebut, maka dilakukan identifikasi jamur dengan menggunakan sekuen daerah ITS dari rDNA isolate jamur yang berasal dari kayu-kayu busuk pada pohon-pohon tersebut.

BAHAN DAN METODE

A. Material kayu dan isolasi jamur

Sampel-sampel kayu berasal dari pohon kanker meranti merah (*Shorea smithiana*) dan meranti kuning (*Shorea gibbosa*) yang mengalami busuk batang. Pohon-pohon tersebut tumbuh di areal Hutan Pendidikan Bukit Soeharto Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur.

Sampel-sampel kayu busuk tersebut ditempatkan pada cawan Petri yang telah berisi media tumbuh jamur 2% MEA (Malt Extract Agar) ditambah 100 ppm chloramphenicol dan 100 ppm benomyl untuk penumbuhan miselium jamur selama beberapa hari. Miselium yang dihasilkan dari isolate-isolate tersebut dipindahkan lagi ke dalam test tube yang telah berisi 5 ml 2% ME (Malt Extract) cair untuk penumbuhan miselium selama 3-5 hari. Seluruh media jamur disterilisasi dengan menggunakan autoclave 0,103 Mpa 121°C selama 20 menit.

B. Ekstraksi DNA dan purifikasi mycelia jamur

Untuk pengekstraksian DNA isolate, miselium yang berasal dari test tube dipindahkan ke dalam microtube. Pengekstraksian DNA jamur dan pengkondisian PCR (*polimerized chain reaction*) mengikuti metode Matsuda dan Hijii (1999) yang merupakan modifikasi dari metode Gardes dan Bruns (1993).

C. Amplifikasi PCR

ITS dan 5.8S gene dari rDNA isolate diamplifikasi menggunakan PCR dengan total volume reaksi 25 μ l [template DNA, ca. 0,5 ng/ μ l; tiap dNTPs, 200 μ M; Taq DNA polymerase (New England Biolabs), 0,5 U; tiap primer, 0,5 μ M, Tris-HCl, 1 mM; KCl, 5mM]. Primer yang digunakan adalah ITS 1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') dan ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), namun jika reaksi PCR tersebut tidak berhasil, maka digunakan primer alternatif ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') untuk menggantikan primer ITS 1F (White *et al.* 1990). Kondisi proses dan temperatur PCR diatur sesuai metode Gardes dan Bruns (1993).

D. Sekuensing dan analisis DNA

Hasil pemurnian produk-produk PCR terhadap daerah-daerah ITS1, ITS2 dan 5,8S dari ribosom DNA kemudian disekuen menurut metode White *et al.* (1990) menggunakan primer ITS1F, ITS5 dan ITS4. Dengan metode pencarian BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), sekuen DNA isolate yang dihasilkan dicocokkan secara online dengan sekuen DNA pada database dari website GenBank NCBI (National Centre for Biotechnology Information) US National Institute of

Health Bethesda. Pencocokan sekuen DNA tersebut menggunakan program "GENETYX-MAC Ver.11.2".

Khusus untuk DNA isolate jamur pembusuk, analisis dilanjutkan dengan menggunakan program Clustal W version 1.83 (1994) secara online dari website DDBJ (DNA Data Bank of Japan). Parameter yang diperoleh digunakan untuk analisis hubungan filogenetik menggunakan program "Bootstrap N-J (*neighbor-joining*) tree (1997)". Untuk mengevaluasi kekuatan daya dukung akurasi cabang grafik pohon N-J, digunakan analisis bootstrap dengan 1000 kali ulangan. Untuk menampilkan grafik pohon tersebut digunakan program TreeView PPC 1.6.6 (2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari pengisolasian jamur diperoleh 3 isolate berasal dari kayu busuk pohon kanker meranti merah dan 8 isolate dari pohon meranti kuning. Berdasarkan hasil analisis sekuen DNA sebagaimana ditampilkan pada **Tabel 1**, hanya dua isolate yang paling memiliki kemiripan dengan DNA jamur Basidiomycetes yang dikategorikan sebagai kandidat jamur pembusuk kayu, yaitu isolate RM4ac dari kayu meranti merah dan isolate YM3ac dari kayu meranti kuning.

Table 1. Information on DNA sequences of the fungal isolates from the decayed wood of *Shorea smithiana* and *Shorea gibbosa* examined in this study and the most similar species registered in GenBank database.

Decayed xylem	Code name ^a	Accession number ^b	Closest match ^c (accession number)	Homology ^d (bps)
<i>Shorea smithiana</i>	RM4ac	AB297718	<i>Schizophyllum commune</i> (AF280758)	100% (632)
	RM3	AB297717	<i>Penicillium daleae</i> (DQ132832)	99% (510)
	RM4	AB297720	<i>Trichoderma asperellum</i> (DQ109538)	100% (411)
<i>Shorea gibbosa</i>	YM3ac	AB297801	<i>Phlebia brevispora</i> (AB084614)	98% (456)
	YM3	AB297795	<i>Aspergillus nomius</i> (DQ467992)	100% (437)
	YM4	AB297796	<i>Phlogicylindrium eucalypti</i> (DQ923534)	87% (563)
	YM8	AB297797	<i>Hypocrea rufa</i> (AJ230677)	98% (589)
	YM10	AB297798	<i>Phlogicylindrium eucalypti</i> (DQ923534)	87% (563)
	YM14	AB297799	<i>Trichoderma virens</i> (AF099007)	100% (596)
	YM3II	AB297800	<i>Talaromyces purpureus</i> (L14527)	92% (480)
	YM8-2	AB297802	<i>Hypocrea lixii</i> (AF443921)	100% (601)

^aCode names that stand for the fungal isolates. ^bAccession numbers for the DNA sequences of the isolates. ^cThe name of fungal species registered in GenBank that

had a sequence with the highest homology to the DNA sequence of the isolates. Unidentified species were ignored. ^dThe homology between reference sequences of the closest match and query sequences of the isolates. Total length of the query sequences are shown in parentheses.

Dari pencarian BLAST dapat diketahui bahwa sekuen ITS dari isolate RM4ac masing-masing memiliki nilai 100% dan isolate YM3ac 98% homolog dengan spesies jamur yang paling mirip pada database. Hasil BLAST terhadap dua isolate tersebut yang menunjukkan jamur Basidiomycetes juga didukung dari analisis filogenetik (**Gambar 1**).

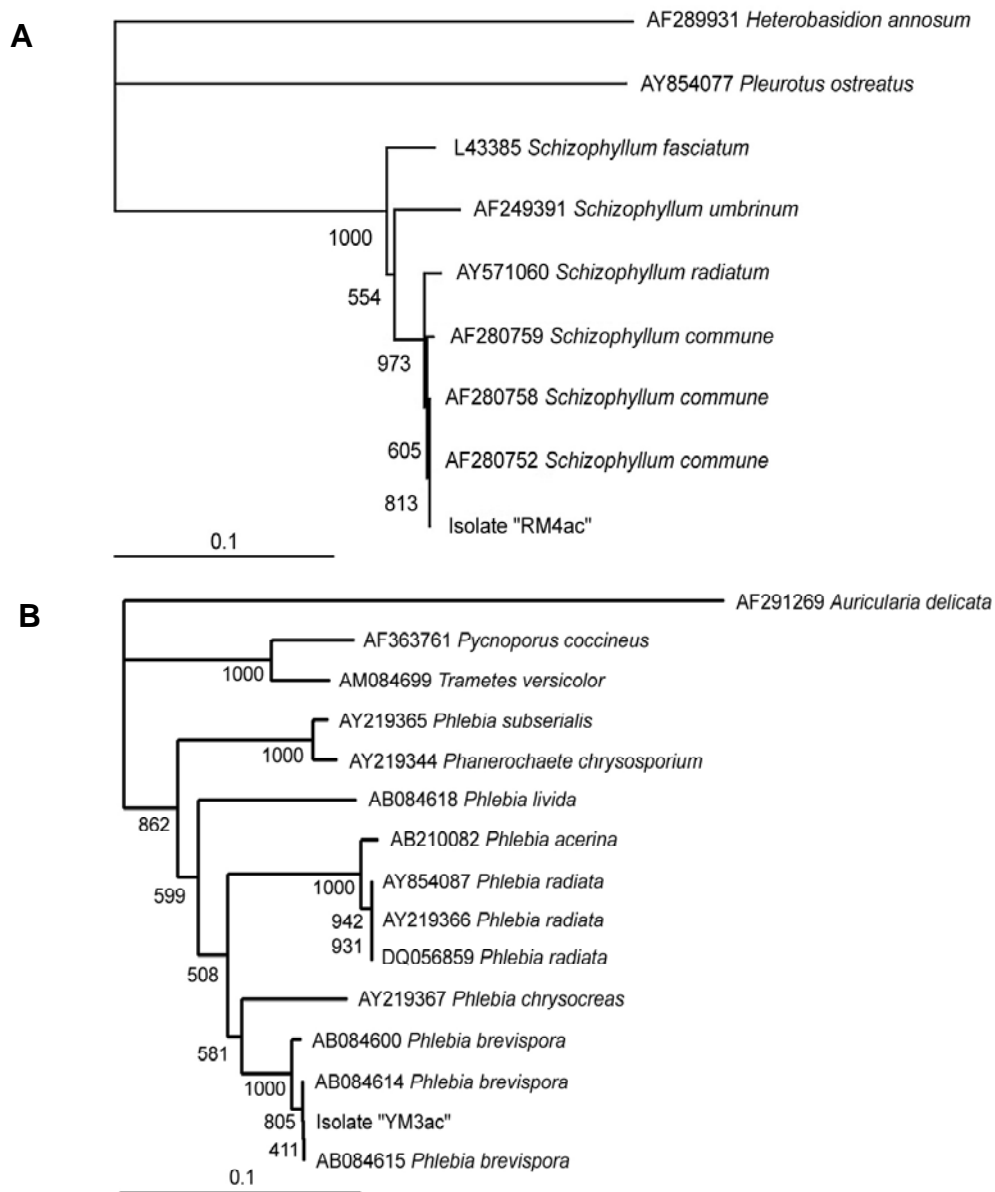


Fig. 1. Neighbor-joining tree derived from the ITS sequences of a fungus isolated from the decayed wood of *Shorea smithiana* and *Shorea gibbosa* canker and reference strains from GenBank. (A) Tree analysis for isolated fungus of *S. smithiana*. The tree was rooted by the outgroup using the sequence of an Aphylophorales fungus, *Heterobasidion annosum*. (B) Tree analysis for isolated

fungus of *S. gibbosa*. The tree was rooted by the outgroup using the sequence of an Auriculariales fungus, *Auricularia elicata*. Bootstrap values higher than 500 out of 1000 are indicated. Bar stands for genetic distance (the number of nucleotide substitution per site)

Dari analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolate RM4ac dan YM3ac berada dalam masing-masing clade dari *Schizophyllum commune* dan *Phlebia brevispora*. Analisis tersebut juga didukung dengan nilai *bootstrap* yang tinggi, yaitu masing-masing 813/1000 untuk *S. commune* dan 805/1000 untuk *P. brevispora*. Ada kesepakatan bahwa antar spesies ditetapkan memiliki kesamaan genetik jika nilai kemiripan pasangan pada pencarian BLAST lebih dari 97,9 % (Kim *et al.* 2005). Berdasarkan nilai kemiripan genetik dari database yang lebih dari 98% kemiripan sekuen (Table 1) dan analisis filogenetik (Gambar 1) terhadap kedua isolate tersebut, maka dapat ditetapkan bahwa masing-masing dari isolate RM4ac dan YM3ac digolongkan sebagai jamur *S. commune* dan *P. brevispora*.

Kedua jamur tersebut telah dikenal sebagai jamur pembusuk putih yang sebelumnya juga ditemukan tumbuh berkembang pada kayu-kayu busuk dari tegakan pohon-pohon di hutan, misalnya *S. commune* pada *Pinus radiata* (Chee *et al.* 1998) dan *Ocotea usambarensis* (Nsolomo *et al.* 2000), dan juga dilaporkan sebagai agen penyebab busuk gubal pada pohon persik china (Dai 2005), sedangkan *P. brevispora* dilaporkan sebagai agen penyebab busuk tunggak pohon *Chamaecyparis obtusa* (Suhara 2005).

Isolate-isolate lain yang teridentifikasi sebagaimana tercantum dalam Tabel 1 adalah tergolong jamur Ascomycetes. Mereka digolongkan jamur yang tidak memiliki kemampuan yang sama seperti jamur Basidiomycetes dalam membusukkan kayu namun mereka memiliki peranan dalam merangsang dan meningkatkan laju kebusukan kayu (Blanchette and Shaw 1978).

KESIMPULAN

Berdasarkan nilai kemiripan genetik dan analisis filogenetik terhadap sekuen daerah ITS dari rDNA dari isolate Basidiomycetes, jamur pembusuk yang tumbuh berkembang pada kayu busuk pohon kanker meranti merah adalah *Schizophyllum commune* dan pohon meranti kuning adalah *Phlebia brevispora*.

Informasi ini tentunya sangat berguna bagi pengembangan lebih lanjut studi pathology, khususnya untuk mengetahui apakah kedua jamur pembusuk tersebut sebagai agen penyebab busuk batang pada pohon kanker meranti atau tidak.

DAFTAR PUSTAKA

- Blanchette RA, Held BW, Jurgens JA., McNew DL, Harrington TC, Duncan SM, Farrell RL (2004) Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. *Applied Environmental Microbiology* 7(3):1328–1335
- Blanchette RA, Shaw CG (1978) Association among bacteria, yeast, and basidiomycetes during wood decay. *Phytopathology* 68:631– 637
- Chee AA, Farrell RL, Stewart A, Hill RA (1998) Decay potential of basidiomycetes fungi from *Pinus radiata*. *Proceedings of the 51st NZ Plant Protection Conference, August 11–13, Wellington, New Zealand*

- Claudia A, Jasalavich, Ostrofsky A, Jellison J (2000) Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11): 4725–4734
- Cortesi P, Fischer M, Milgroom MG (2000) Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. *Phytopathology* 90:967–972
- Dai YC (2005) First report of sapwood rot of peach caused by *Schizophyllum commune* in China. *Plant Dis.* 89:778
- Diehl SV, McElroy TC, Prewitt ML (2004) Development and implementation of a DNA – RFLP database for wood decay and wood associated fungi. International Research Group on Wood Preservation IRG 35, IRG/WP 04-10527, pp 1-18
- Erwin, W.J. Hwang and Y. Imamura (2005a). Analysis of the infection of canker fungi on light red meranti (*Shorea smithiana*): A scanning electron microscopic study. Proceedings of the 6th International Wood Science Symposium. LIPI – JSPS Core University Program in the Field of Wood Science, August 29 – 31, Denpasar, Indonesia
- Erwin, W.J. Hwang, S. Takemoto, M. Takeuchi, T. Itoh and Y. Imamura (2006b). Decay features of xylem on the cankerous tree of tropical wood species. Proceedings of Botany 2006 Conference. July 28 – August 2, Chico, United State of America
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2:113–118
- Hibbett DS, Donoghue MJ (2001) Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Systematic Biology* 50(2):215-242
- Kim GH, Lim YW, Song YS, Kim JJ (2005) Decay fungi from playground wood products in service using 28S rDNA sequence analysis. *Holzforschung.* Vol.59:459–466
- Matsuda Y, Hijii N (1999) Characterization and identification of *Strobilomyces confusus* Ectomycorrhizas on Momi Fir by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of the rDNA. *J.For.Res.* 4:145–150
- Nsolomo VR, Venn K, Solheim H (2000) The ability of some fungi to cause decay in east african camphor tree, *Ocotea usambarensis*. *Mycol. Res.* 104(12):1473 – 1479
- Rahayu S (1998) Penyakit tanaman hutan di Indonesia: Gejala, penyebab, dan teknik pengendaliannya. Kanisius. Yogyakarta, pp 48–55
- Schmidt O (2006) Wood and tree fungi. Biology, damage, protection, and use. Springer-Verlag. Berlin, pp 135–146
- Suhara H, Maekawa N, Kubayashi T, Kondo R (2005) Specific detection of a basidiomycete, *Phlebia brevispora* associated with butt rot of *Chamaecyparis obtusa*, by PCR-based analysis. *J Wood Sci* 51:83–88

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols. Academic Press, San Diego, pp 315–322